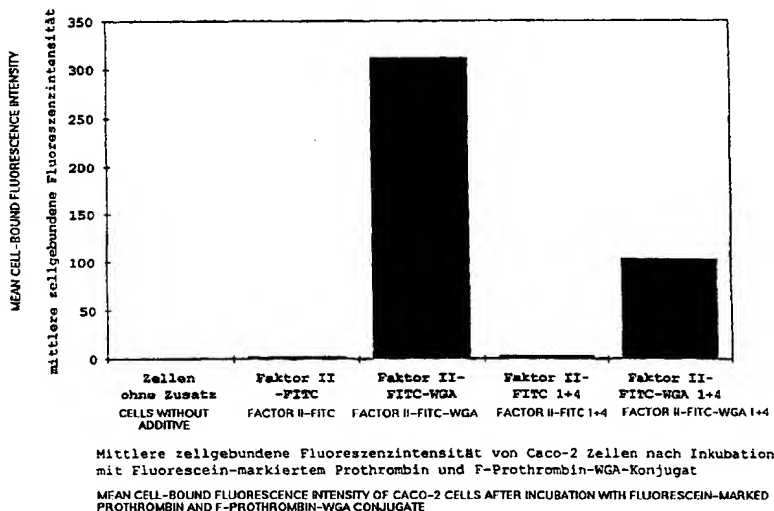


**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 47/48</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/64072</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 16. Dezember 1999 (16.12.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/AT99/00150 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 9. Juni 1999 (09.06.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> A 1009/98 10. Juni 1998 (10.06.98) AT A 701/99 20. April 1999 (20.04.99) AT <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> TURECEK, Peter [AT/AT]; Hauptstrasse 59g, Weidling, A-3400 Klosterneuburg (AT). GABOR, Franz [AT/AT]; Am Schmiedberg 7, A-3385 Gerersdorf (AT). WIRTH, Michael [AT/AT]; Hubergasse 11, A-1160 Wien (AT). <b>(74) Anwälte:</b> SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).			<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

**(54) Title:** CONJUGATE CONSISTING OF A LECTIN AND A BLOOD COAGULATION FACTOR**(54) Bezeichnung:** KONJUGAT, BESTEHEND AUS EINEM LEKTIN UND EINEM BLUTGERINNUNGSFAKTOR**(57) Abstract**

The invention relates to a pharmaceutical preparation comprising a lectin to which a protein obtained from blood is bonded in a stable manner for administration.

**(57) Zusammenfassung**

Beschrieben wird ein pharmazeutisches Präparat, umfassend ein Lektin, an das ein aus Blut gewinnbares Protein verabreichungsstabil gebunden ist.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

- 1 -

## KONJUGAT, BESTEHEND AUS EINEM LEKTIN UND EINEM BLUTGERINNUNGSFAKTOR

Die Erfindung betrifft pharmazeutische Präparationen umfassend Lektine und pharmazeutische Wirkstoffe.

Das Konzept des "Drug Targeting" ist durch die Tatsache begründet, daß viele Arzneimittel in bezug auf deren Aufnahme- oder Wirkungsloci in den Zellen nicht selektiv sind. Besonders auf dem Gebiet der Chemotherapie bei Krebserkrankungen führt die Wirkung der eingesetzten Arzneimittelsubstanzen in Nicht-Zielzellen zu schweren unerwünschten Nebenwirkungen, die eine erfolgreiche Therapie gefährden können (1). Die Verwirklichung der gezielten Zuführung von Arzneimittelsubstanzen zu den spezifischen Zielzellen wurde bislang durch große Schwierigkeiten bei der Auffindung geeigneter Carrier-Moleküle, die in eine spezifische Wechselwirkung mit der betroffenen (Ziel-)Zelle treten können, gehindert. Mit dem Fortschritt in der Biotechnologie wurden monoklonale Antikörper (2) und rekombinante Proteine (3), welche spezifisch an bestimmte Loci binden können, als vielversprechende Kandidaten für aktive und zielgerichtete Arzneimittelzufuhr etabliert. Weiters wurden auch kolloidale Partikel, wie Albumin- oder Polystyrol-Mikrokügelchen, für passiven Arzneimittel-Transport in bestimmte Kompartimente verwendet (4,5).

Lektine, die eine wichtige Rolle bei der biologischen Signalübermittlung, bei Zell/Zell- und Zell/Matrix-Wechselwirkungen spielen, sind eine weitere Gruppe von Molekülen, von denen man annimmt, daß sie zur zielgerichteten Arzneimittel-Verabreichung verwendet werden können. Es ist bekannt, daß Lektine, die ursprünglich als Proteine in Pflanzenextrakten identifiziert worden waren, in der Lage sind, an bestimmte Oligosaccharid-Gruppen zu binden (6). Es wurde vorgeschlagen, unter Ausnutzung dieser Kohlehydrat-spezifischen Wechselwirkung Lektine in einem zielgerichteten "Drug Delivery"-System einzusetzen (7), da das Glykosylierungsmuster von Zellen nach maligner Transformation verändert ist (8).

Weizenkeim-Agglutinin (wheat germ agglutinin; WGA) ist ein dime-

res, Kohlehydrat-freies Protein, welches aus zwei identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 35 kDa besteht. Jede monomere Untereinheit enthält zwei identische und unabhängige Bindungsstellen für N-Acetyl-D-glukosamin (9). Nachdem Weizenkeime, die rund 300 mg WGA pro kg enthalten (10), zur normalen Ernährung des Menschen gehören, ist die perorale Toxizität zu vernachlässigen. WGA bindet spezifisch an N-Acetyl-D-glukosamin-hältige Strukturen. Es wurde durch Sättigungsanalysen mit Fluoreszenz-markiertem Lektin gefunden, daß die WGA-Bindungskapazität von Colonkarzinom-Zellen (Caco-2-Zellen) rund 13mal höher ist als die von menschlichen Colonozyten (11).

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine pharmazeutische Präparation zur Verfügung zu stellen, mit welcher die Vorteile des Lektin-Systems bei der Zielzellenerkennung für die zielgerichtete Zufuhr von Arzneimitteln an spezifische Zielzellen ausgenützt werden können, ohne daß es dabei zu wesentlichen Nebenwirkungen, insbesondere zu toxischen Nebenwirkungen oder Nebenwirkungen, die durch Wirkung auf Nicht-Zielzellen hervorgerufen werden, kommt.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein pharmazeutisches Präparat, welches ein Lektin, an das aus Blut gewinnbares Protein, insbesondere in Blutgerinnungsfaktor oder dessen rekombinantes Äquivalent verabreichungsstabil gebunden ist, umfaßt.

Als Lektin wird bevorzugterweise ein Lektin verwendet, das pflanzlichen Ursprungs ist, wobei vor allem solche Pflanzenlektine verwendet werden können, die als gewohnte Nahrungsmittelquellen des Menschen bekannt sind, wie z.B. auch Weizen, Soja, Reis, Bohnen, Gerste, Roggen, usw.. Die Spezifität von Lektinen ist für die meisten bekannten Lektine bereits ausreichend beschrieben (vgl. Stryer, Biochemistry, 2. Auflage (1994), Seiten 311 und 359; Römpf, Chemielexikon, 10. Auflage (1997), Seiten 2382 bis 2384), kann jedoch auch (z.B. für neu entdeckte Lektine oder für modifizierte Lektine) mit bekannten Methoden analysiert werden. Dies gilt insbesondere für die jeweiligen Bindungsspezifitäten für bestimmte Kohlehydratstrukturen von ausgewählten Zielzellen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kommen auch bevorzugt solche Lektine zum Einsatz, die lang bekannt und gut beschrieben sind, wie z.B. Concanavalin A, Abrin, Ricin, Phasin oder WGA, da bei diesen Systemen auch Modifikationen ohne größeren Aufwand bewerkstelligt werden können. Derartige Modifikationen (z.B. bezüglich der Bindungsstelle zum aus Blut gewinnbaren Protein oder im Erkennungsbereich für die Kohlehydratstruktur der Zielzelle) können zwar auch bei weniger gut beschriebenen oder völlig neuen Lektinen mit Methoden, die dem Fachmann bekannt sind, bewerkstelligt werden, jedoch ist dies meist arbeitsaufwendiger als bei bekannten Lektinen.

Erfindungsgemäß hat sich der Einsatz von WGA besonders bewährt, da dieses praktisch keinerlei perorale Toxizität aufweist und eine hohe Spezifität gegenüber malignen Zellen aufweist. Insbesondere aufgrund der hohen Spezifität gegenüber Colonkarzinom-Zellen ist es besonders bei der zielgerichteten Arzneimittelzufuhr in diese Zellen geeignet. Unter WGA werden erfindungsgemäß auch chemisch modifizierte WGA-Moleküle oder WGA-Derivate verstanden, die die wesentlichen Eigenschaften des (nativen) WGA aufweisen bzw. bei welchen die Bindungsspezifität gezielt und kontrolliert verändert worden ist.

Unter verabreichungsstabiler Verbindung wird erfindungsgemäß eine Verbindung verstanden, die eine ausreichende Stabilität des erfindungsgemäßen Präparats bei der Lagerung, bei der Verabreichung und beim Weg im Patienten zum Ziellocus gewährt. Wesentlich ist aber auch, daß diese Verbindung zwischen Lektin und dem aus Blut gewinnbaren Protein im Zielkompartiment gespalten werden kann, oder der Arzneistoff auf andere Weise seine Wirkung entfalten kann. Demgemäß kommen beispielsweise eine säure- oder basenlabile Verbindung oder eine durch ein für die Zielkompartimente spezifisches Enzym, z.B. eine Protease oder Nuklease, spaltbare Verbindung zur Anwendung. Unter Zielkompartimenten werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung beispielsweise Zellen, Gewebe oder Teile eines Gewebes, insbesondere Blut oder Gewebsflüssigkeiten, verstanden.

Die erfindungsgemäßen Präparate zeigen einen hohen antiprolife-

- 4 -

rativen Effekt auf die Zielzellen, da das konjugierte aus Blut gewinnbare Protein leicht und effektiv in die Zielzelle bzw. die Zielkompartimente aufgenommen wird. Es kommt daher zu einer intrazellulären Akkumulation der erfindungsgemäßen Präparate. Im WGA-System ermöglicht die säurelabile cis-Aconityl-Verbindung eine Freisetzung des aus Blut gewinnbaren Proteins erst im lysosomalen Bereich der Zielzelle.

Als aus Blut gewinnbares Protein zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung ist prinzipiell jedes Blutprotein oder dessen rekombinantes Äquivalent geeignet, das eine Bindung mit Lektinen eingehen kann. Diese Bindung kann auch, wenn sie mit den nativen Lektinen nicht möglich ist, durch Modifikation von bestimmten Bindungsstellen oder Aminosäure-Seitenketten ermöglicht werden. Auch können, ausgehend von bekannten aus Blut gewinnbaren Proteinen, speziell für die vorliegende Erfindung geeignete abgeleitete Blutproteine "designed" werden, die eine Bindung mit Lektinen eingehen können. Aufgrund der abnormen Veränderung der Glykokalyx (die gewebsspezifische Polysaccharidschicht, die jede Eukaryonten-Zelle umgibt und aus membranständigen Glykoproteinen und Glykolipiden aufgebaut ist), die oft mit einer malignen Transformation verbunden ist, eignet sich das erfindungsgemäße Lektin-"Drug-Targeting" hervorragend zur Verabreichung von Zytostatika oder anderen Krebs-Behandlungsmitteln.

Beispiele für erfindungsgemäß einzusetzendes Blutprotein umfassen Blutgerinnungsfaktoren wie Prothrombin oder die Faktoren V, VII, VIII, IX, X, XI, XII oder XIII, vWF, Inhibitoren wie ATIII, oder Heparin, Protein C, Protein S,  $\alpha_1$ -saures Glykoprotein, oder Gewebefaktoren, sowie gegebenenfalls Vorstufen dieser Proteine.

Diese Substanzen, z.B. Doxorubicin (DOX), können vorteilhafterweise über eine säurelabile Bindung (z.B. die cis-Aconityl-Brücke an WGA) gebunden werden und können als Modellbeispiel ebenfalls zur Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung herangezogen werden. Es zeigte sich, daß eine Zweischnitt-Kopplungsreaktion (siehe Beispiele) von DOX an WGA ein wasserlösliches Prodrug (DOX-WGA) mit einem Substitutionsgrad von 24 mol

DOX/mol WGA ergibt. Dieses Prodrug ist im neutralen Milieu stabil, bei pH 4,0 werden jedoch innerhalb von 24 Stunden  $46 \pm 7\%$  des WGA-gebundenen DOX freigesetzt. Damit wird das Zytostatikum erst im intralysosomalen, sauren Milieu verfügbar. Die DOX-WGA-Bindungskapazität von Colonkarzinom-Zellen ist zumindest 4,5mal höher als jene von humanen Colonozyten und lymphoblastischen MOLT-4-Zellen, eine Bindung an Erythrozyten ist nicht meßbar.

Unter Berücksichtigung der Freisetzungsrates des Arzneistoffes aus dem Konjugat ist die zytostatische Wirkung des Arzneistoffes in Konjugatform auf Karzinomazellen zumindest 1,5mal höher als jene des freien Zytostatikums. Die antiproliferative Wirkung von DOX-WGA auf Lymphoblasten ist hingegen um 65% geringer als jene des freien Wirkstoffes. Im Gegensatz zum freien Wirkstoff wird aber durch die erfindungsgemäße zielgerichtete Zuführung eine enorme Verringerung der Nebenwirkungsrate ermöglicht, sei es durch die geringere Beeinträchtigung von Nicht-Zielzellen oder sei es durch einen verringerten Einsatz des Zytostatikums (durch Dosisreduktion). Damit wird die Therapie des Tumors, z.B. die Therapie des Colonkarzinoms durch DOX-WGA, um vieles angenehmer.

Da Arzneimittel auf Proteinbasis, durch den Verbund mit den Lektinen zusätzlich zur zielgerichteten Verabreichung auch z.T. erheblich stabilisiert werden, was bei fragilen Proteinarzneimitteln sehr hilfreich sein kann, können mit dem erfindungsgemäßen System durch die Kopplung an Lektine erfolgreich und gezielt hochmolekulare Proteinarzneimittel, wie Blutgerinnungsfaktoren oder andere aus Blut gewinnbare Proteine, wie Inhibitoren oder Cofaktoren, oder deren rekombinante Äquivalente verabreicht werden.

Da die meisten Lektine, insbesondere pflanzliche, wie WGA, gastrointestinal stabil sind, können daher die erfindungsgemäßen Präparate peroral verabreicht werden, wobei lediglich gegebenenfalls eine übliche magensaftresistente Hüllschicht vorgesehen werden kann, was zu einer weiteren Erleichterung der Therapie führt.

Das erfindungsgemäße System eignet sich auch hervorragend zur

Verabreichung von Nukleinsäuren, beispielsweise zur Gentherapie oder für Antisense-Therapie. Hierbei kann die Nukleinsäure, z.B. cDNA, Antisense-RNA, ..., wie ein normales Blutprotein an das Lektin gebunden werden. Bei WGA kann dies selbstverständlich auch über die säurelabile Bindungsstelle erfolgen.

Die erfindungsgemäßen Präparate werden bevorzugterweise in den üblichen und für das jeweilige aus Blut gewinnbare Protein günstigen Verabreichungsformen zur Verfügung gestellt. Die Dosierung kann sich an der üblichen Dosierung für das Protein orientieren, wobei, bedingt durch die effizientere Verabreichung, eine Dosisreduktion in Erwägung gezogen werden kann. Auch können die üblichen, bewährten Hilfssubstanzen für das Medikament verwendet werden, oft ist aber mit der erfindungsgemäßen Formulierung eine verbesserte Wasserlöslichkeit (bedingt durch die Lektine) verbunden, womit z.B. Lösungsvermittler reduziert oder sogar weggelassen werden können. Auch kann durch die erhöhte Stabilität der erfindungsgemäßen Präparate die Verwendung großer Mengen an Stabilisatoren vermieden werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und den Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht eingeschränkt sein soll, näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1: das in vitro-Freisetzungsprofil von DOX aus DOX-WGA

Fig. 2: die Zell-gebundene Fluoreszenz-Intensität von DOX-WGA

Fig. 3: Caco-2-Zellen, inkubiert mit DOX-WGA

Fig. 4: die Wirkung von F-WGA und WGA auf Caco-2-Zellwachstum

Fig. 5: die antiproliferative Wirkung von WGA, DOX-WGA und DOX

Fig. 6: die Wirkung von WGA, DOX-WGA und DOX auf Caco-2-Zellwachstum



Fig. 7: die Fluoreszenzintensität von Caco-2-Zellen nach Inkubation mit markierten Prothrombin und Prothrombin-WGA.

## Beispiele:

### Materialien und Methoden

#### Chemikalien

Weizenkeim-Agglutinin aus *Triticum vulgare* und sein Fluorescein-markiertes Analogon (Molverhältnis Fluorescein/Protein = 3,2) wurde von Vektor Laboratories (Burlingame, U.S.A.) erworben. Doxorubicin, cis-Aconitsäureanhydrid, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid,  $\epsilon$ -Amino-n-capronsäure und N-Hydroxysuccinimid wurden von Sigma (St.Louis, MO, U.S.A.) erhalten; alle anderen Chemikalien wurden als analytisch rein ("analytical grade") von Merck (Darmstadt, DE) erworben. Die Gewebeskulturreagentien stammten von Biowhittaker (Workingham, UK), Sets für XTT-(EZ4U) und BrdU-Test wurden von Biomedica (Wien, Österreich) bzw. Boehringer Mannheim (Wien, Österreich) erworben.

#### Konjugation von Doxorubicin mit WGA

N-cis-Aconityl-doxorubicin wurde gemäß Yang und Reisfeld (12) mit Modifikationen hergestellt. Alle Reaktionen wurden unter Lichtschutz durchgeführt und mittels DC auf KGF<sub>254</sub> unter Verwendung von Chloroform/Methanol/Wasser 9+9+1,8 oder 8+10+2,5 (V/V/V) als mobile Phase überwacht. DOX (1,79  $\mu\text{mol}$ ) wurden in 1,5 ml Methanol gelöst und mit einer etherischen Lösung von cis-Aconitinsäureanhydrid (5,2  $\mu\text{mol}$ ) 1 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Eindampfen auf 500  $\mu\text{l}$  wurde Doxorubicin-cis-aconitat durch Umsetzung mit 7,2  $\mu\text{mol}$  N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid und 7,2  $\mu\text{mol}$  N-Hydroxysuccinimid aktiviert. Die Reaktionsmischung wurde 2 h lang bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C gerührt. Dicyclohexylharnstoff wurde durch Zugabe von 1 ml 3% wässriger Natriumbicarbonat-Lösung ausgefällt und durch 5minütige Zentrifugation bei 7500 U/min gesammelt. Das restliche Methanol wurde aus dem Überstand durch Abdampfen entfernt.

Der Doxorubicin-cis-aconitat-N-hydroxysuccinimid-ester wurde

durch tropfenweise Zugabe einer Lösung enthaltend 0,033  $\mu\text{mol}$  WGA in 500  $\mu\text{l}$  3% wässrigem Natriumbicarbonat, pH 8,0, mit WGA konjugiert. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurde das Konjugat (DOX-WGA) gegen 20 mM HEPES/NaOH-Puffer, pH 7,4, bei 4°C dialysiert, bis kein freies Arzneimittel mittels spektrophotometrischer Untersuchung des Dialyse-Mediums bei 468 nm nachgewiesen wurde (Detektionsgrenze: 2  $\mu\text{g/ml}$  DOX). Nach DC war DOX-WGA die einzige fluoreszierende Verbindung, die beobachtet wurde, was darauf hinweist, daß kein detektierbares freies DOX vorhanden war.

### **Ermittlung der Kopplungsrate**

Die Anzahl von DOX-Molekülen, die pro Molekül WGA gekoppelt sind, wurde aus der Absorption bei 468 nm in bezug auf WGA in 20 mM HEPES-Puffer, pH 7,4, errechnet, wobei DOX zur Eichung verwendet wurde (U-3000 UV-VIS Spektrophotometer, Hitachi).

### **Bestimmung von Amino-Resten an WGA**

Die Gesamtanzahl von WGA-Aminogruppen, die einer Derivatisierung zugänglich waren, wurde mittels eines modifizierten Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)/Adipinsäure-dihydrazid (ADH)-Tests (13) bestimmt. Kurz gesagt wurden 200  $\mu\text{l}$  einer Lösung enthaltend 125-175  $\mu\text{g}$  WGA in 20 mM HEPES, pH 7,4, mit 200  $\mu\text{l}$  0,02% TNBS in gesättigtem Natriumtetraborat/destilliertem Wasser (1+1, V/V) gemischt und 10 min lang bei 70°C inkubiert. Nach der Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  0,5 M wässriger ADH-Lösung und sanftem Schütteln am Vortex wurde die Absorption von Trinitrobenzol-adipinsäure-dihydrazon bei 520 nm abgelesen. Die Anzahl von Amino-Resten wurde aus einer Eichkurve unter Verwendung von  $\epsilon$ -Amino-n-capronsäure berechnet. Der Test ermöglicht eine Quantifizierung von 80-680 nmol Amino-Resten/ml.

### **In vitro-Freisetzung von konjugiertem Doxorubicin.**

\*Untersuchungen betreffend die *in vitro*-Freisetzung von DOX aus dem Konjugat wurden bei 37°C unter Lichtschutz durchgeführt. Ein kleiner Dialyse-Schlauch (MW cut-off 12 kDa) enthaltend 250  $\mu\text{l}$

DOX-WGA, entsprechend 7,5 µg DOX, wurde in ein Schraubröhrchen, gefüllt mit 1,5 ml 0,1 M Phosphat/Citrat-Puffer, pH 4,0, gegeben. Um eine ungestörte Diffusion von freigesetztem DOX zu gewährleisten, wurden Luftblasen sorgfältig von der Oberfläche der Membran entfernt. Während das Dialyse-Medium gerührt wurde, wurden 500 µl Aliquots in regelmäßigen Abständen entnommen und sofort nach dem Ablesen der Absorption bei 468 nm in das Gefäß zurückgegeben. Die Menge des DOX, die vom Konjugat freigesetzt worden war, wurde aus einer DOX-Eichkurve errechnet.

### **Zellen und Kulturbedingungen**

Die humane Colonkarzinom-Zelllinie Caco-2 und die humane Lymphoblasten-Zelllinie MOLT-4 wurden von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.) erhalten. Die Zellen wurden in einem Kulturmedium bestehend aus RPMI-1640 mit 10% fötalem Kälberserum, 4 mM L-Glutamin und 75 µg/ml Gentamycin in einer angefeuchteten 5% CO<sub>2</sub>/95% Luft-Atmosphäre bei 37°C gezüchtet und durch Trypsin-Behandlung subkultiviert.

Humane Colonozyten wurden aus normalem Gewebe angrenzend an eine resezierte Colonkarzinom-Probe erhalten. Das Gewebe wurde durch etwa einstündige Inkubation in Kollagenase-Lösung (1000 E/ml Medium) bei 37°C dissoziiert, bis einzelne Zellen freigesetzt waren, wie mittels Lichtmikroskopie gezeigt. Die Zellen wurden wiederholt mit PBS mit 5minütiger Zentrifugation bei 4°C bei 1300 U/min gewaschen. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, und das Präparat wurde unter Verwendung eines Casyl DT-Zellzähler- und Analysator-Systems (Schärfe, DE) analysiert. So bestand das Zell-Präparat aus 1x10<sup>6</sup> Colonozyten/ml (Durchmesser 7-10 µm), und 17x10<sup>6</sup> Zellen/ml, die einen Durchmesser von weniger als 7 µm aufwiesen, hauptsächlich rote Blutkörperchen, wie mittels Lichtmikroskopie beobachtet wurde.

### **Bindung von DOX-WGA an humane Colonozyten, Caco-2 und MOLT-4-Zellen**

Unter Verwendung einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurden 50 µl Zellsuspension (5x10<sup>4</sup> Colonozyten oder Lymphoblasten)

in PBS, 100  $\mu$ l 20 mM HEPES, pH 7,4, und 50  $\mu$ l einer Lösung enthaltend 3,6, 1,8 oder 0,9  $\mu$ g DOX-WGA in HEPES 1 h, 2 h oder 12 h lang bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min, 4°C), und 120  $\mu$ l des Überstands wurden verworfen. Nach Zugabe von 120  $\mu$ l HEPES wurde der Wasch-Schritt auf dieselbe Weise wiederholt. Die Zellen wurden in 1,8 ml Cell Pack resuspendiert und mittels Durchfluß-Zytometrie untersucht.

Bei jedem Experiment wurden negative Kontrollen bestehend aus unmarkierten Zellen zwecks Bestimmung der Autofluoreszenz inkludiert. Jede Konzentration wurde vierfach getestet und mindestens zweimal wiederholt.

### Durchfluß-Zytometrie

Die Durchfluß-Zytometrie-Messungen wurden an einem Epics XL-MLC-Analyse-Durchfluß-Zytometer (Coulter, FL, U.S.A.) durchgeführt. Die markierten Zellen wurden unter Verwendung eines "Forward versus side scatter gate" zum Erfassen einzelner Zellpopulationen und Ausschluß von Zellrückständen und Zellaggregaten analysiert. Fluoreszenz wurde bei 575 nm nachgewiesen (10 nm Bandbreite), und der Mittelwert der Kanalzahl der logarithmischen Fluoreszenz-Intensitäten einzelner Peaks wurde für weitere Berechnungen verwendet. Die Amplifikation der Fluoreszenz-Signale wurde eingestellt, um das Autofluoreszenz-Signal unmarkierter Zellen in die erste Dekade des 4-Dekaden umfassenden log-Bereichs zu stellen. Für jede Messung wurden 5000 Zellen akkumuliert.

### Konfokale Mikroskopie

Die Zellen wurden durch einstündige Inkubation von 100  $\mu$ l Zellsuspension ( $2 \times 10^6$ /ml HEPES) mit 100  $\mu$ l einer Lösung von DOX-WGA (69  $\mu$ g/ml HEPES) oder Fluorescein-markiertem WGA (100  $\mu$ g/ml HEPES) bei 37°C gefärbt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 1000 U/min), zweimal wie oben beschrieben jedoch unter Verwendung von 150  $\mu$ l HEPES gewaschen und zwecks Mikroskopie auf einen Träger aufgebracht. Konfokale Bilder von mittels Fluoreszenz markierten Zellen wurden unter Verwendung eines konfokalen

Zeiss Axiovert-Mikroskops erhalten. Transmissionslicht und Fluoreszenz-Bilder wurden in 40-facher Vergrößerung erhalten, und intrazelluläres DOX sowie Fluorescein wurden durch Erregung bei 488 nm und Emission >515 nm nachgewiesen.

### **Zellproliferationstests**

Die Zellproliferation wurde mit dem XTT- und dem BrdU-Test bestimmt, welche gemäß den Vorschriften der Hersteller unter Verwendung von farblosem supplementierten RPMI 1640-Medium für Zellkultur durchgeführt wurden.

Um den Einfluß von WGA und F-WGA auf die Zellproliferation von Caco-2 zu errechnen, wurden 100 µl Zell-Suspension ( $2 \times 10^4$  Zellen) und 75 µl je einer Verdünnungsserie von WGA und F-WGA (0, 0,06, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 1,5, 3, 6 und 30 µg) unter Gewebeskulturbedingungen für 3 Tage inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 20 µl XTT-Reagens-Lösung. Die Absorption des gebildeten Formazans wurde bei 450 nm (Anthos ELISA Reader 2001) gegen eine negative Kontrolle, bestehend aus Medium und XTT-Reagens-Lösung, bestimmt.

Die zytotoxische Aktivität von DOX-WGA wurde mittels des XTT-Tests, wie oben beschrieben, bestimmt, wobei jedoch  $10^4$  MOLT-4- oder Caco-2-Zellen/100 µl RPMI 1640-Medium und je 75 µl einer Lösung enthaltend DOX (0,15 oder 0,10 µg), WGA (0,45 oder 0,32 µg) bzw. DOX-WGA (0,57 oder 0,41 µg) verwendet wurden.

Außerdem wurde die Zellproliferation von Caco-2-Zellen, die mit DOX-WGA vorbehandelt worden waren, untersucht, wobei ein colorimetrischer Immunttest, der BrdU-Test, verwendet wurde. Je 75 µl einer Lösung enthaltend WGA (0,6, 0,43, 0,30 µg), DOX (0,15, 0,11, 0,075 µg) oder DOX-WGA (0,57, 0,41, 0,285 µg) in HEPES wurden in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte, die 100 µl Zell-Suspension ( $5 \times 10^3$  Caco-2-Zellen) enthielt, zugegeben. Nach 96stündiger Inkubation unter Zellkulturbedingungen wurden 20 µl BrdU-Markierungslösung zugegeben, gefolgt von einer weiteren 14-stündigen Inkubation. Der Überstand wurde verworfen, und nach Zugabe von 200 µl FixDenat-Lösung waren die Zellen fixiert und

die DNA denaturiert. Der Überstand wurde 30 min später entfernt, und 100  $\mu$ l BrdU-Antikörper-Peroxidase wurden zugegeben. Nach 90-minütiger Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 200  $\mu$ l Wasch-Puffer gewaschen, und 100  $\mu$ l Substrat wurden zugegeben. Nach 10 min wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 25  $\mu$ l 1M Schwefelsäure gestoppt, und die Absorption wurde bei 450 nm gegen den Leerwert, hergestellt wie oben beschrieben, doch unter Auslassung der Zellen, gemessen.

Alle Tests wurden vierfach durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt. Außerdem wurden in jedem Experiment positive Kontrollen durch Auslassen der untersuchten Substanzen inkludiert.

## Ergebnisse

### Herstellung und Charakterisierung von cis-Aconityl-gebundenem Doxorubicin-WGA (DOX-WGA)

Zur Verwendung von WGA als Carrier-Protein zur gezielten Pro-drug-Zuführung von DOX wurde das zytostatische Mittel in einem zweistufigen Verfahren kovalent an das Protein gebunden. Zuerst wurde das Arzneimittel quantitativ in das entsprechende Carbonsäure-Derivat durch Umsetzen des freien Amino-Restes von Daunomycin mit cis-Aconitinsäureanhydrid übergeführt ( $R_{f\text{Produkt}}=0,21$ ,  $R_{f\text{DOX}}=0,14$ ; Chloroform/Methanol/Wasser, 9+9+1,8 (V/V/V)). Anders als in der Literatur beschrieben (12), ergab die Umsetzung N-cis-Aconityl-DOX nur in wasserfreiem Medium. Trotz der Bildung von beidem, dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ -Monoamid-Isomer, wurde nach DC nur ein Fleck beobachtet.

Um eine Quervernetzung von WGA durch Voraktivierung des Proteins zu vermeiden, wurde das N-cis-Aconitat-DOX mit Dicyclohexylcarbodiimid/N-Hydroxysuccinimid umgesetzt, um ein aktives Ester-Zwischenprodukt vor der Kopplung (14) zu bilden. Wie mittels DC (Chloroform/Methanol/Wasser 8+10+2,5 (V/V/V)) angezeigt, wurde das N-cis-Aconityl-Derivat ( $R_f=0,24$ ) in den korrespondierenden N-Hydroxysuccinimid-Ester ( $R_f=0,88$ ) in einem Ausmaß von etwa 75% übergeführt. Unter Beteiligung des aktiven Esters entweder des  $\beta$ - oder des  $\gamma$ -Carboxyl-Rests von cis-Aconitat-Doxorubicin wurde

das Arzneimittel mit den zugänglichen Amino-Resten von WGA konjugiert, wobei eine Amid-Bindung gebildet wurde. UV-Differenzspektroskopie des gereinigten Konjugats bestätigte eine kovalente Bindung von DOX am Carrier-Protein, was zu einer Konjugationszahl von etwa 24 mol DOX/mol WGA führt. Da WGA eine Mischung von Isolektinen enthaltend  $24 \pm 1,53$  Aminogruppen (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=6$ ) darstellt, wie mittels TNBS/ADH-Test bestimmt, ergab die Kopplungsreaktion dicht beschichtetes Lektin, das jedoch noch immer frei wasserlöslich ist.

Da vom cis-Aconityl-Spacer berichtet worden war, daß er eine pH-empfindliche Bindung (15) für die intralysosomale Freisetzung des konjugierten Arzneimittels sei, wurde das Freisetzungs-Profil von konjugiertem DOX bei pH 4,0 *in vitro* spektrophotometrisch bestimmt, wobei ein Dialyseschlauch zum Ausschließen des Konjugats verwendet wurde. Innerhalb von 24 h Inkubation bei einem pH-Wert von 4,0 wurden  $46 \pm 7\%$  konjugiertes DOX von WGA freigesetzt; nach einer längeren Inkubation stieg jedoch die Freisetzungsrate nicht deutlich an, da die 168stündige Einwirkung von saurem Milieu auf DOX-WGA zu einer Freisetzung von  $51 \pm 6\%$  konjugiertem DOX führte. Wie durch das Freisetzungs-Profil angezeigt, war die Hälfte des verfügbaren Arzneimittels nach 65 min freigesetzt (Fig. 1).

#### **Bindung von DOX-WGA an Caco-2-Zellen, humane Colonozyten und Lymphoblasten**

Zur Bestimmung der Konjugat-Bindungskapazität von Ziel- und Nicht-Zielzellen ließ man zunehmende Mengen von DOX-WGA mit einer bestimmten Anzahl von Zellen verschiedenen Ursprungs in Wechselwirkung treten und untersuchte sie mittels Durchfluß-Zytometrie. Diese Technik ermöglicht eine Quantifizierung nur der an Zellen gebundenen Fluoreszenz-Intensität (16). Caco-2-Zellen wurden als Vertreter für maligne transformierte Zellen verwendet, während humane Colonozyten und die humanen lymphoblastischen MOLT-4-Zellen als Modell für nicht beeinflusste bzw. Stammzellen inkludiert wurden. Im Vergleich zur Autofluoreszenz der Zellen ( $0,6 \pm 0,1$ ) nahm der Mittelwert der an Zellen gebundenen Fluoreszenz-Intensität der Caco-2-Zellen nach Zugabe von

DOX-WGA deutlich zu und ergab  $11,8 \pm 0,7$  -  $37,9 \pm 0,1$  relative Fluoreszenz-Intensität gleichzeitig mit einer zunehmenden Konzentration des Konjugats. Dagegen führte die Bindung zunehmender Mengen von DOX-WGA an Nicht-Zielzellen zu einer eher geringen und wenig ansteigenden, an Zellen gebundenen Fluoreszenz-Intensität im Bereich von  $2,4 \pm 0,05$  bis  $8,5 \pm 1,0$  (humane Colonozyten) bzw.  $2,5 \pm 0,07$  bis  $9,3 \pm 0,1$  (MOLT-4). Da der Mittelwert der an Zellen gebundenen Fluoreszenz-Intensität nach Zugabe zunehmender Mengen von DOX-WGA zunahm, könnte die Bindung an die untersuchten Zelllinien einer spezifischen Wechselwirkung zugeschrieben werden (Fig. 2).

Da die Präparation humaner Colonozyten 94% Zellen verschiedener Art enthielt, hauptsächlich Erythrozyten, wurde die Konjugat-Bindung durch Einstellen des "Forward versus side scatter gate" untersucht, um ausschließlich die Zell-Population von  $<7 \mu\text{m}$  aufzuzeichnen. Da die mittlere relative Fluoreszenz-Intensität von 0,3 den Autofluoreszenz-Bereich dieser Zellen abdeckte, kann die DOX-WGA-Bindung an Erythrozyten vernachlässigt werden.

Im allgemeinen war die DOX-WGA-Bindungskapazität von Caco-2-Zellen  $4,6 \pm 0,3$ -mal höher als jene humaner Colonozyten. Die Menge des an MOLT-4-Zellen gebundenen DOX-WGA war in derselben Größenordnung wie die von humanen Colonozyten, nur  $10 \pm 3\%$  höher. Nicht nur die Bindung an die Caco-2-Membran, sondern auch die Aufnahme von DOX-WGA wurde durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von lebensfähigen Caco-2-Zellen, die mit dem Konjugat vorinkubiert worden waren, beobachtet (Fig. 3). Nach einstündiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  sammelte sich das fluoreszierende DOX-WGA-Konjugat in der Nähe der Kernmembran der sich teilenden Caco-2-Zelle an. Dagegen wurde, wenn Caco-2-Zellen mit Fluorescein-markiertem WGA unter denselben Bedingungen gefärbt wurden, das Lektin über das Zytoplasma verteilt, wobei einige intensiv gefärbte granulare Bereiche vorlagen, was eine vesikuläre Akkumulation anzeigt. Somit folgt auf die Zellbindung des Konjugats die Aufnahme des Prodrugs, wobei jedoch das intrazelluläre Verteilungsmuster von der für die Konjugation verwendeten Substanz abhängig ist.



### Antiproliferative Wirkungen von DOX-WGA auf Tumorzellen und Lymphoblasten

Die Wirkung von WGA, F-WGA, DOX und DOX-WGA auf das Wachstum von Tumorzellen wurde mittels des XTT-Tests untersucht. Bei diesem Test wird das Tetrazol-Salz XTT durch lebensfähige Zellen metabolisch reduziert, die das lösliche, stark gefärbte Formazan ergeben, das ein Indikator für die Zellproliferation ist. Obwohl WGA die Proliferation von Caco-2-Zellen in Dosis-abhängiger Weise inhibierte und eine 50% Hemmung des Zellwachstums ( $IC_{50}$ ) bei  $530 \pm 40$  ng WGA/ $2 \times 10^4$  Caco-2-Zellen zeigte, wie aus einer sigmoidalen Kurve nach Boltzman errechnet, hatten WGA-Konzentrationen von  $< 60$  ng/Vertiefung keinen wesentlichen Einfluß auf das Zellwachstum (Fig. 4). Dagegen veränderte eine Markierung von WGA unter Verwendung von Fluorescein-Isothiocyanat die Hemmaktivität des Lektins und führte zur  $IC_{50} = 623 \pm 84$  ng F-WGA/ $2 \times 10^4$  Caco-2-Zellen. Außerdem stimulierte nach Zugabe geringerer Mengen als 54 ng F-WGA das markierte Lektin die Proliferation von Caco-2-Zellen.

Unter Berücksichtigung des Einflusses des nicht-modifizierten Carrier-Proteins auf die Hemmaktivität von DOX-WGA waren die Konzentrationen von WGA und DOX, die im XTT-Test angewendet wurden, gleich dem Konjugat, um eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Daten vorzusehen. Während WGA das Caco-2-Zellwachstum in einem Ausmaß von  $40,3 \pm 14,6\%$  (bei  $450$  ng WGA/ $10^4$  Zellen) und  $6,7 \pm 3,3\%$  (bei  $320$  ng WGA/ $10^4$  Zellen) hemmte, nahm die zytostatische Aktivität von DOX-WGA auf Caco-2-Zellen zu bei einer gleichzeitigen Abnahme der WGA-Konzentrationen um  $14,3 \pm 8,3\%$  bzw.  $34,0 \pm 6,1\%$  (Fig. 5A). Andererseits ergaben äquivalente Mengen von DOX-WGA 63% oder 46% der antiproliferativen Wirkung von DOX.

Im Vergleich zu Caco-2-Zellen übten gleiche Mengen der untersuchten Substanzen einen geringeren Einfluß auf die Lebensfähigkeit lymphoblastischer MOLT-4-Zellen aus (Fig. 5B). Während DOX das Zellwachstum in einem Ausmaß von etwa  $13 \pm 5,2\%$  hemmte, betrug die Hemmaktivität von DOX-WGA auf MOLT-4-Zellen  $9,4 \pm 3,2\%$  (bei  $450$  ng/ $10^4$  Zellen) bzw.  $5,0 \pm 2,6\%$  (bei  $320$  ng/ $10^4$  Zellen).

Im Gegensatz zum XTT-Test war der Einfluß des Carrier-Proteins alleine auf die Proliferation von Caco-2-Zellen ein ganz anderer, wie mittels Quantifizierung des DNA-Gehalts durch den BrdU-Test bestimmt. Während die Konzentration des Carrier-Proteins von 600 auf 300 ng WGA/5000 Zellen abnahm, wurde anfänglich keine wesentliche Hemmwirkung ( $4,6 \pm 12,3\%$ ) beobachtet, doch wurde diese Wirkung in eine zunehmende Stimulation des Caco-2-Zellwachstums umgewandelt (Fig. 6). Andererseits zeigten im Vergleich zu DOX-WGA, äquivalente Mengen des freien Arzneimittels eine hohe zytostatische Aktivität, was zu einer Wachstumshemmung von durchschnittlich  $95,2 \pm 2,1\%$  führte. Nach Vorinkubation von Caco-2-Zellen mit DOX-WGA nahm die antiproliferative Aktivität äquivalenter Dox-Mengen um  $20 \pm 5,6\%$  ab.

## Diskussion

Um einen Vorteil aus der sehr verschiedenen WGA-Bindungskapazität von Caco-2-Zellen und humanen Colonozyten für die zielgerichtete Zufuhr von Arzneimitteln zu Colonkarzinom-Zellen *in vitro* (11) zu ziehen, wurde DOX durch einen zweistufigen Mechanismus über eine säureempfindliche cis-Aconitinsäure-Bindung kovalent an WGA gekoppelt (12). Da WGA eine Mischung aus vier Isolektinen (17) darstellt, wurde für die Bewertung der Kopplungseffizienz durch eine Kombination des TNBS-Tests mit ADH festgestellt, daß die Anzahl der Amino-Reste an WGA  $24 \pm 1,4$  ist. Die Kopplung wurde qualitativ und quantitativ durch UV/VIS-Differenz-Spektroskopie bestätigt und ergab ein Konjugat frei von nachweisbarem, nicht-kovalent gebundenem Arzneimittel, das 24 Mol DOX/Mol WGA enthielt. Trotz einer Derivatisierung fast aller zugänglichen Amino-Reste von WGA wurde die Wasserlöslichkeit von DOX-WGA beibehalten. Gemäß der Literatur (15) war die cis-Aconityl-Bindung zwischen dem Arzneimittel und WGA pH-empfindlich, wobei sie bei pH 7,0 stabil war, und wies eine Halbwertszeit von 1 h bei pH 4,0 auf. Innerhalb von 168 h wurden jedoch nur 50% des Arzneimittelgehalts aus DOX-WGA freigesetzt, im Vergleich zu einer fast 100% Freisetzung des mit einem Antikörper konjugierten Daunomycin bei einem pH-Wert von 3,0 (14). Bei unserer Arbeit wurde N-cis-Aconityl-Doxorubicin in aprotischen Milieu aktiviert, was vermutlich gleiche Mengen des N-Hydroxy-Succinimid-

esters von sowohl  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Carboxyl ergab. Da eine freie cis-Carbonsäure-Funktion eine Voraussetzung für eine pH-Empfindlichkeit der Bindung ist (15), kann die Freisetzung von lediglich der Hälfte des konjugierten DOX der Bildung einer Amid-Bindung zwischen WGA und dem  $\beta$ -Carboxyl des  $\alpha$ -Monoamid-Isomers von N-cis-Aconityl-Doxorubicin zuzuschreiben sein.

Wie mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie von F-WGA und DOX-WGA bestätigt wurde, behielt das N-Acetylglucosamin-spezifische Lektin seine bioadhäsiven und cytoinvasiven Eigenschaften nach Konjugation des zytostatischen Mittels bei. Infolge der Säureempfindlichkeit der Bindung wird eine intralysosomale Freisetzung von konjugiertem DOX erwartet, wenn DOX-WGA das saure Milieu des lysosomalen Kompartiments erreicht. Als Folge der Derivatisierung wurde das intrazelluläre Verteilungsmuster von WGA verändert, was zur Akkumulation von DOX-WGA nahe der Kernmembran von Caco-2-Zellen führte.

Die Bindungs-Spezifität des Konjugats wurde mittels durchflußzytometrischer Bestimmung von zellgebundener Fluoreszenz-Intensität, die von DOX-WGA stammt, bewertet. Unabhängig von der Einwirkungszeit zeigte DOX-WGA eine Dosis-abhängige Bindung an Ziel- und Nicht-Zielzellen, wobei jedoch das Ausmaß sehr verschieden war. Im Durchschnitt überstieg die Bindungskapazität der Colonkarzinom-Zellen Caco-2 jene der humanen Colonozyten und lymphoblastischen MOLT-4-Zellen um ein 4,5-Faches. Außerdem wurde keine Bindung von DOX-WGA an humane Erythrozyten nachgewiesen. Diese Ergebnisse sind Indikatoren für eine hohe Ziel-Spezifität des Konjugats. Unter Berücksichtigung des hohen Ausmaßes der Kopplung könnte das abnehmende Verhältnis der Bindung an Caco-2-Zellen gegenüber humanen Colonozyten von 13:1 (F-WGA, 11) auf 4:1 (DOX-WGA) mit einer dichten Derivatisierung des Lektins durch das hydrophobe Anti-Krebs-Arzneimittel in Verbindung stehen, wie sie für Immunkonjugate beobachtet wurde (18).

Als die Auswirkungen von WGA und F-WGA auf die Mitose untersucht wurden durch Bestimmung der mitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität, wurden gemäß Ryder et al. (19) reversierende Wirkungen auf das Zellwachstum von Caco-2 beobachtet: bei vergleichbaren

Konzentrationen zeigte das native Lektin eine Dosis-abhängige Hemmung des Caco-2-Zellwachstums, doch nach Konjugation des Fluoresceins kehrte sich diese Hemmwirkung um in eine Stimulation bei Konzentrationen von  $<54 \text{ ng F-WGA}/2 \times 10^4$  Zellen. Wie von Kawamoto et al. (20) beobachtet, hemmte der epidermale Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) die Proliferation von epidermoiden A431-Karzinom-Zellen im nM-Bereich, hatte jedoch eine mitogene Wirkung im pM-Bereich. Da die Tyrosin-Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors durch WGA in einem ähnlichen Ausmaß aktiviert wurde wie die durch den epidermalen Wachstumsfaktor induzierte Verbesserung (21), ist diese Wirkung möglicherweise auf eine EGF-Rezeptor-Bindung von WGA zurückzuführen.

Der Beitrag des Carrier-Proteins von DOX-WGA zur antiproliferativen Wirkung des Kojugats auf Caco-2-Zellen war jedoch ziemlich gering, da die Hemmaktivität äquivalenter Mengen von WGA und DOX-WGA  $6,7 \pm 3,3\%$  bzw.  $39 \pm 6,1\%$  betrug. Somit stammt die zytostatische Aktivität von DOX-WGA hauptsächlich vom konjugierten Arzneimittel und ergibt etwa 60% der zytostatischen Aktivität von freiem DOX. Bei Durchführung des XTT-Tests mit lymphoblastischen MOLT-4-Zellen als Modell für Nicht-Zielzellen wurde das Zellwachstum durch DOX-WGA in Dosis-abhängiger Form im Vergleich zu freiem DOX (100%) in einem Ausmaß von bestenfalls 35% gehemmt. Diese abnehmende antiproliferative Aktivität äquivalenter Mengen von DOX auf Nicht-Zielzellen könnte der zielgerichteten Zuführung des Anti-Krebs-Mittels nach Konjugation mit WGA zuzuschreiben sein.

Da ein unbeeinträchtigtes Wachstum von mit äquivalenten Mengen des Carrier-Proteins vorinkubierten Caco-2-Zellen für eine eindeutige Berechnung der antiproliferativen Aktivität von DOX-WGA notwendig ist, wurde die BrdU-Inkorporierung während der DNA-Synthese entsprechend der Anzahl der sich teilenden Zellen bestimmt. Bei äquivalenten Konzentrationen von WGA und DOX im Vergleich zu DOX-WGA, hemmte das Carrier-Protein alleine das Caco-2-Zellwachstum nur geringfügig oder stimulierte es, und das freie Arzneimittel zeigte im Durchschnitt eine 95% Wachstumshemmung. Die antiproliferative Wirkung von konjugiertem DOX hatte einen Mittelwert von 78%. Wenn man eine nur 50% Freisetzung von

gebundenem DOX *in vitro* annimmt, könnte die zytostatische Wirkung von DOX-WGA infolge der stellen-spezifischen Effizienz von konjugiertem DOX gleich oder etwas höher sein als jene des freien Arzneimittels.

### **Herstellung eines WGA-Prothrombin-Konjugates**

Prothrombin - Blutgerinnungsfaktor II - ist ein Plasmaprotein aus der Gruppe der Vitamin K-abhängigen Proteine mit einer Molekülmasse von 72.000 Dalton. Prothrombin wird therapeutisch angewendet und ist essentieller Bestandteil von Prothrombinkomplexkonzentraten, welche zur Prophylaxe und zur Therapie von Blutungen bedingt durch angeborene oder erworbene Mängel an Prothrombinkomplexfaktoren eingesetzt werden.

Prothrombin (Faktor II) wurde aus Prothrombinkomplexkonzentrat hergestellt nach Brummelhuis (23) durch Adsorption an Calciumphosphat und Elution mit Natriumphosphat, durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF (Pharmacia, Uppsala, Schweden) sowie durch hydrophobe Chromatographie über Phenyl-Sepharose gereinigt. Für die folgenden Synthesen wurde eine Präparation verwendet, die einen Faktor II-Gehalt von 12,3 mg FII/ml Citratpuffer (13,6 mM Na-Citrat, 137 mM NaCl, pH 7,0) aufwies.

Das gereinigte Prothrombin wurde gemäß dem folgenden Prinzip mit WGA konjugiert.

Eine Disuccinimidylsuccinatlösung (voraktivierter Spacer) wurde durch Inkubation von N-Hydroxysuccinimid und Bernsteinsäureanhydrid mit Carbodiimid hergestellt und zur Aktivierung des mit Fluorescein (FITC) markierten Prothrombins eingesetzt. Das so hergestellte, derivatisierte Prothrombin mit aktiven N-Hydroxysuccinimidester-Gruppierungen wurde anschließend zur Kupplung an WGA verwendet. Auf diese Weise wurden zwei verschiedene Proben hergestellt (Synthese gemäß Ansatz 1 bzw. 2)

### **Markierung von Faktor II mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)**

Zur Markierung von Faktor II mit Fluorescein wurde FITC in einer Mischung aus Faktor II-Lösung und Reaktionspuffer (25 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 8,0) gelöst und über 5 Stunden (Ansatz 1) bzw. über Nacht (Ansatz 2) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die angegebenen molaren Verhältnisse wurden auf der Basis von 29 freien Aminogruppen des Prothrombins (N-Terminus und Lysinreste) kalkuliert.

Ansatz 1 (2 Mol FITC/Mol  $\text{NH}_2$ )

2,9 mg FITC (V,5  $\mu\text{Mol}$ )

750  $\mu\text{l}$  FII-Lösung (9,2 mg FII/0,13  $\mu\text{Mol}$ )

750  $\mu\text{l}$  Puffer

Ansatz 2 (0,3 Mol FITC/Mol  $\text{NH}_2$ )

0,45 mg FITC (1,16  $\mu\text{Mol}$ )

750  $\mu\text{l}$  FII-Lösung (9,2 mg FII/0,13  $\mu\text{Mol}$ )

750  $\mu\text{l}$  Puffer

Zur Abtrennung des Reagens vom markierten Faktor II wurde über Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in DMSO/Hepes-Puffer, pH 8,0; 1+1-Mischung) chromatographiert. Die Fraktionen im Ausschlußvolumen (ca. 2,0 ml) wurden gesammelt und für die weitere Synthese eingesetzt.

**Synthese des voraktivierten Spacers**

Der voraktivierte Spacer wurde durch Inkubation von 14 mg (125  $\mu\text{Mol}$ ) N-Hydroxysuccinimid, 5 mg (50  $\mu\text{Mol}$ ) Bernsteinsäureanhydrid und 96 mg (500  $\mu\text{Mol}$ ) 1-Ethyl-3-dimethylaminopropyl-carbodiimid (EDAC) in 3 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) über 20 Minuten unter leichtem Schütteln hergestellt.

**Aktivierung von FITC-markiertem Prothrombin**

Die Aktivierung von FITC-markiertem Prothrombin erfolgte durch die folgenden beiden Reaktionsansätze. Die Gemische wurden jeweils über eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Ansatz 1

300 µl variabler Spacer  
2,7 ml DMSO  
2,0 ml FITC-markiertes Prothrombin

Ansatz 2

75 µl variabler Spacer  
2,925 ml DMSO  
2,0 ml FITC-markiertes Prothrombin

Nach der Reaktion wurde in jeweils zwei Durchgängen über Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) (in DMSO/Hepes-Puffer = 1 + 1) chromatographiert; Puffersystem: 25 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 8,0. Dazu wurden jeweils 2,5 ml auf die Säule aufgetragen. Die Fraktionen im Ausschlußvolumen wurden vereinigt und für die Konjugation mit WGA eingesetzt.

**Umsetzung des aktivierten Prothrombin-Derivates mit WGA**

Die Kupplung mit WGA (Fa. Vector) erfolgte durch Zugabe des festen Lektins zur Lösung des aktivierten Prothrombins bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln über Nacht.

Ansatz 1

1,25 mg WGA  
1,8 ml Lösung aktiviertes Prothrombin

Ansatz 2

1,7 mg WGA  
3,7 ml Lösung aktiviertes Prothrombin

Abschließend wurde jedem Ansatz 5 mg Glycin zugesetzt und über eine Sephadex G-25-Säule in 0,9 %iger NaCl-Lösung (Ansatz 1) bzw. 25 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,2 (Ansatz 2) chromatographiert. Die Chromatographie wurde für Ansatz 2 in 2 Säulenläufen durchgeführt.

**HPLC -Analysen**

Sämtliche Zwischenprodukte der Synthesen wurden mittels HPLC-Analyse unter Verwendung einer HPLC-Gelfiltrationsäule untersucht.

HPLC-System: Bio-Rad Model 8441 AT mit Model 1790 UV/VIS-Monitor  
Säule: Bio-Rad Bio-Sil SEC 125, 300 x 7,8 mm (Trennbereich: ca. 5.000-150.000 Da)

Elution: PBS-Puffer, pH 7,2

Flußrate: 0,5 ml/min

Messung der UV-Absorption bei 280 nm

Die Methode wurde für die Abschätzung der Proteinkonzentrationen und zum Nachweis der Änderung der Proteingröße während der Reaktion verwendet.

### **Charakterisierung der Endprodukte**

Die HPLC-Analyse für beide Endprodukte zeigt nur ein Signal im Ausschlußvolumen der Gelfiltrationssäule an, das auf ein Molekulargewicht von größer als 150.000 Da hindeutet. WGA und Prothrombin konnten nicht nachgewiesen werden.

Die SDS-Gelelektrophorese mit einem nicht reduzierenden 12,5 %igen Gel und anschließender Silberfärbung zeigt für die beiden Proben die folgende Banden:

#### Probe 1

Kein WGA nachweisbar

Schwache Faktor II-Bande bei ca. 70.000

Diskrete Doppelbande (schwach) bei ca. 250.000 Da

Größter Teil des Proteins an der Auftragstelle ( $> 1 \times 10^6$  Da)

#### Probe 2

Schwache WGA-Bande bei ca. 30.000 Da nachweisbar

Deutliche Faktor II-Bande bei ca. 70.000 Da erkennbar

Konjugate von ca. 150.000 bis  $> 1 \times 10^6$  Da (sehr starke Banden) erkennbar.



Über beide Syntheseansätze konnte also eine Konjugation des Prothrombins mit WGA erreicht werden, wobei der Derivatisierungsgrad durch die Wahl der Reaktionsbedingungen und den Aktivierungsgrad der Kupplungspartner gesteuert werden konnte.

#### **Charakterisierung der cytoadhäsiven Eigenschaften des Fluorescein-markierten Prothrombin-WGA-Konjugates**

Die Bestimmung der cytoadhäsiven Eigenschaften des Konjugates (Ansatz 1) erfolgte mittels Durchflußzytometrie, wo ausschließlich zellgebundene, fluoreszierende Stoffe erfaßt werden. Die Bindungsstudie wurde bei 4°C durchgeführt, um mögliche durch Weizenlektin verursachte Internalisationsprozesse auszuschließen. In diesem Temperaturbereich werden alle energieabhängigen Transportprozesse weitgehend ausgeschlossen, so daß nur die Bindungsrate an die Zelloberfläche der Colonicarcinomzellen erfaßt wird.

Als Modell für intestinale Enterozyten wurden Caco-2 Einzelzellen verwendet, deren Differenzierungsmuster humanen Enterozyten entspricht und die als in vitro-Modell für den humanen Dünndarm etabliert und oben beschrieben sind.

#### Durchführung

50 µl Caco-2-Zellsuspension (6 Millionen/ml) wurden mit 50 µl Konjugatlösung (unverdünnt, 1+4 verdünnt) und 100 µl PBS-Puffer (Ca und Mg-hältig) 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1000 rpm) und 130 µl Überstand abgehoben und durch PBS ersetzt. Nach zweimaligem Waschen wurden 1000 µl PBS (partikelfrei) zugesetzt und im Flow-Cytometer analysiert.

Als Leerwert diente eine entsprechende Zellsuspension in PBS, als Vergleich eine analog bereitete Präparation mit fluoreszenzmarkiertem Prothrombin.

### Ergebnis

Die Zellsuspension zeigte kein Signal einer zellgebundenen Fluoreszenz. Während fluoreszenzmarkierter Faktor II eine äußerst geringe Bindungsrate an Caco-2-Zellen zeigte (unverdünnt: 1,62, 1+4, verdünnt 2,57, mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität), wurde das Konjugat aus fluoreszenzmarkiertem Faktor II und Weizenlektin äußerst stark an Caco-2-Zellen gebunden. Die mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität betrug 311 (unverdünnt) bzw. 103,4 (1+4 verdünnt).

Demnach wurde fluoreszenzmarkiertes Prothrombin erst durch die Kopplung an Weizenlektin an die Oberfläche von Caco-2-Zellen gebunden (siehe Fig. 7). Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß durch selektives Drug Targeting der Blutgerinnungsfaktor Prothrombin einem Zielkompartiment, im Fall der gezeigten Experimente einer Modellzelle für das Dünndarmepithel, zugeführt werden kann. Weizenlektin vermittelt demzufolge cytoadhäsive Eigenschaften, die für eine mögliche Resorbierbarkeit von Faktor II Voraussetzung sind. Durch die Anlagerung an die Zelloberfläche könnte einerseits durch unspezifische Endocytose, andererseits allein durch lokale Erhöhung des Konzentrationsgradienten zwischen Extrazellulär- und Intrazellulärraum eine erhöhte Diffusion und damit eine Resorbierbarkeit nach peroraler Applikation möglich sein.

**Literaturstellen:**

1. R. Duncan, T.A. Connors und H. Meada, Drug targeting in cancer therapy: the magic bullet, what next? *J. Drug Targeting* 3:317-319 (1996).
2. G.R. Thrush, L.R. Lark, B.C. Clinchy und E.S. Vitella, Immunotoxins: an update. *Ann. Rev. Immunol.* 14:49-71 (1996).
3. F. Gabor, I. Haberl, M. Wirth, K. Richter, G. Theyer, G. Baumgartner, H. Wenzl und G. Hamilton. In vitro antitumor activity of MIC2 protein-doxorubicin conjugates. *Int. J. Onc.* 9:527-531 (1996).
4. S.S. Davis und L. Illum. Colloidal carriers and drug targeting. *Acta Pharm. Technol.* 32:4-9 (1986).
5. J. Kreuter. Nanoparticulate systems in drug delivery and targeting. *J. Drug Targeting.* 3:171-173 (1995).
6. N. Sharon und H. Lis, Lectins: cell agglutination and sugar specific proteins. *Science* 177:949-959 (1972).
7. C.M. Lehr in Lectins-Biomedical Perspectives. A. Pusztai und S. Bardocz (Hrsg.) Taylor & Francis Ltd., London 1995.
8. A. Shanghal und S. Hakamori. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioessays* 12:223-230 (1990).
9. I.E. Liener, N. Sharon und I.E. Goldstein, The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine, Academic Press, Orlando, Florida, 1986.
10. A. Pusztai, S.W.B. Ewen, G. Grant, D.S. Brown, J.C. Stewart, W.J. Peumans, E.J.M. van Damme und S. Bardocz, Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine-specific lectins. *Br.J.Nutr.* 70:313-321 (1993).

11. F. Gabor, M. Wirth, G. Walcher und G. Hamilton. Lectin-mediated Bioadhesion: Gastrointestinal stability and Binding-characteristics of *Wheat Germ Agglutinin* and *Solanum Tuberosum* Lectin on Caco-2, HT-29 and Human Colonocytes. *J. Contr. Rel.* 49:27-37 (1997).
12. H.S. Yang und R.A. Reisfeld. Doxorubicin conjugated with a monoclonal antibody directed to a human melanoma-associated proteoglycan suppresses the growth of established tumor xenografts in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:1189-1193 (1988).
13. M. Wilchek, T. Miron und J. Kohn. Affinity chromatography. *Methods Enzymol.*, 104:3-55 (1981).
14. R.O. Dillman, D.E. Johnson, D.L. Shawler und J.A. Koziol, Superiority of an acid-labile daunorubicin-monoclonal antibody immunoconjugate compared to free drug. *Cancer Res.* 48: 6079-6102 (1988).
15. W.C. Shen und H.J.-P. Ryser, Cis-aconityl spacer between daunomycin and macromolecular carriers: a model of pH-sensitive linkage releasing drug from a lysosomotropic conjugate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102:1048-1054 (1981).
16. M. Ramanathan. Flow cytometry applications in pharmacodynamics and drug delivery, *Pharm. Res.* 14:1106-1114 (1997).
17. K.A. Kronis und J.P. Carver, Specificity of isolectins of wheat germ agglutinin for sialyloligosaccharides: a 360-Mhz proton nuclear magnetic resonance binding study, *Biochemistry* 21: 3050-3057 (1982).
18. Z. Brich, S. Ravel, T. Kissel, J. Fritsch und A. Schoffmann. Preparation and characterization of a water soluble dextran immunoconjugate of doxorubicin and the monoclonal antibody (ABL364). *J. Contr. Rel.* 19:245-258 (1992).
19. S.D. Ryder, J.A. Smith, E.G. Rhodes, N. Parker und J.M. Rhodes. Proliferative responses of HT-29 and Caco-2 human

colorectal cancer cells to a panel of lectins. *Gastroenterology* 106:85-93 (1994).

20. T. Kawamoto, J.D. Sato, A. Le, J. Polikoff, G.H. Sato und J. Mendelsohn. Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: Identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1337-1341 (1983).
21. F.Y. Zeng, A. Bengurfa, S. Kafert, S. Andre, H.J. Gabius und A. Villalobo. Differential response of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity to several plant and mammalian lectins, *Mol. Cell Biochem.* 142:117-124 (1995).
22. W.Yin und P.W. Cheng. Lectin conjugate-directed gene transfer to airway epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 205:826-833 (1994).
23. Brummelhuis HGJ, Preparation of the Prothrombincomplex, *Methods of Plasma Protein Fractionation*. Edited by Curling JM., Academic Press, New York, 1980, pp. 117-128.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Pharmazeutisches Präparat, umfassend ein Lektin, an das ein aus Blut gewinnbares Protein, insbesondere ein Blutgerinnungsfaktor, oder dessen rekombinantes Äquivalent verabreichungsstabil gebunden ist.
2. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein pflanzliches Lektin ist.
3. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ausgewählt ist aus Concanavalin A, Abrin, Ricin, Phasin oder WGA, insbesondere WGA.
4. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichungsstabile Bindung zwischen Lektin und dem Protein eine säurelabile, kovalente Bindung ist.
5. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die verabreichungsstabile Bindung zwischen Lektin und dem Protein durch eine Protease, die spezifisch für Zielkompartimente ist, gespalten wird.
6. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein modifiziertes Lektin ist.
7. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein an seinem Zielkompartiment zum Arzneimittel modifiziertes Lektin ist.
8. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Lektin ein an seiner Bindungsstelle zu Zielkompartimenten modifiziertes Lektin ist.
9. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es zur peroralen Verabreichung kon-

fektioniert ist und gegebenenfalls eine magensaftresistente Hüllschicht aufweist.

10. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das WGA ist und das Protein über die säurelabile cis-Aconityl-Bindung verbunden ist.

11. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es als Prodrug-Formulierung vorliegt.





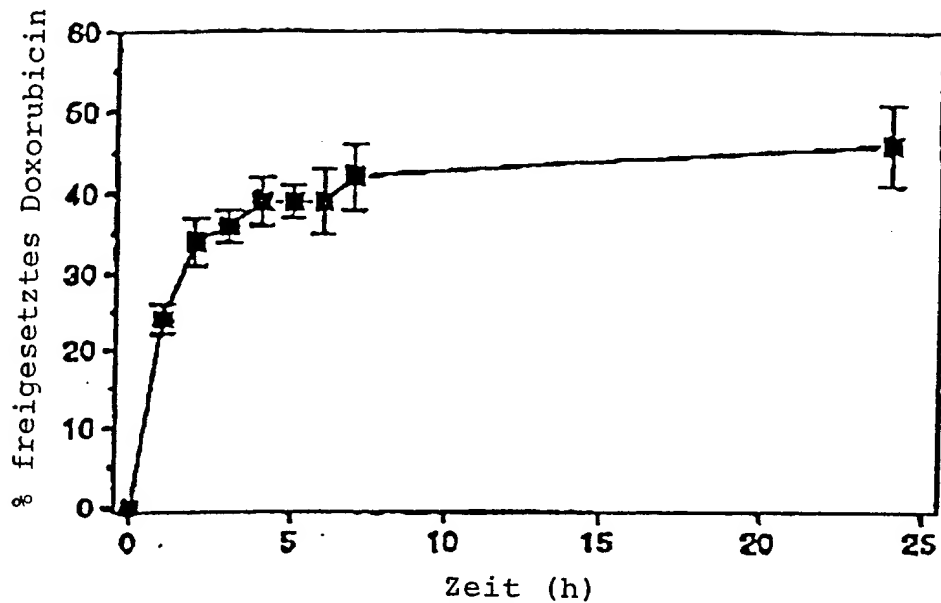


Fig. 1. In vitro-Freisetzungsprofil von DOX aus DOX-WGA in 0,1 M Zitrat/Phosphat-Puffer, pH 4,0, bei 37°C (n = 3, Mittelwert  $\pm$  S.A.)

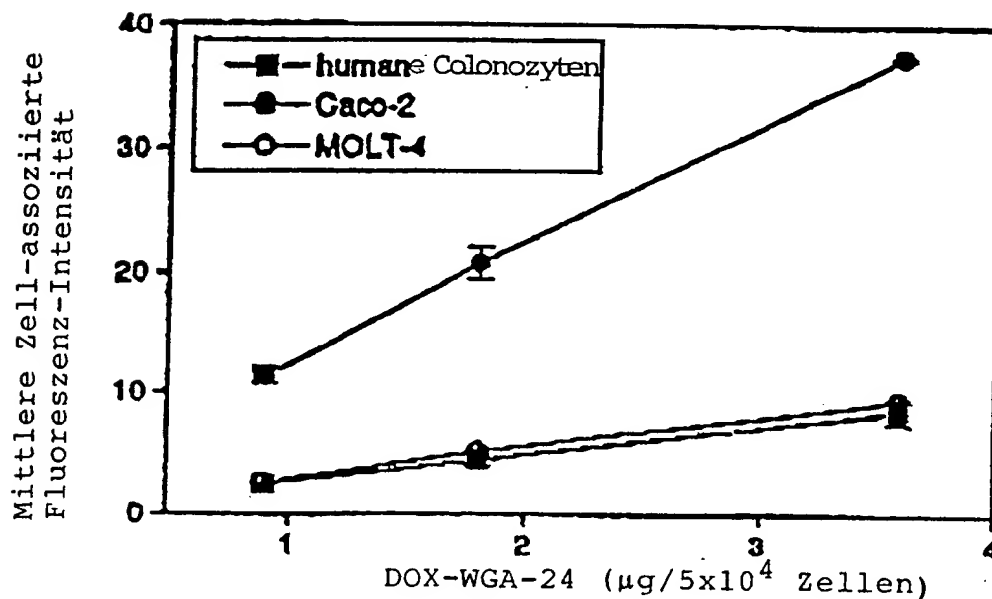


Fig. 2. Zell-gebundene Fluoreszenz-Intensität von DOX-WGA, bei 4°C 2 h lang inkubiert mit humanen Colonozyten, MOLT-4- und Caco-2-Zellen, nach Subtraktion der Autofluoreszenz der Zellen (n = 8, Mittelwert  $\pm$  S.A.)



2/5

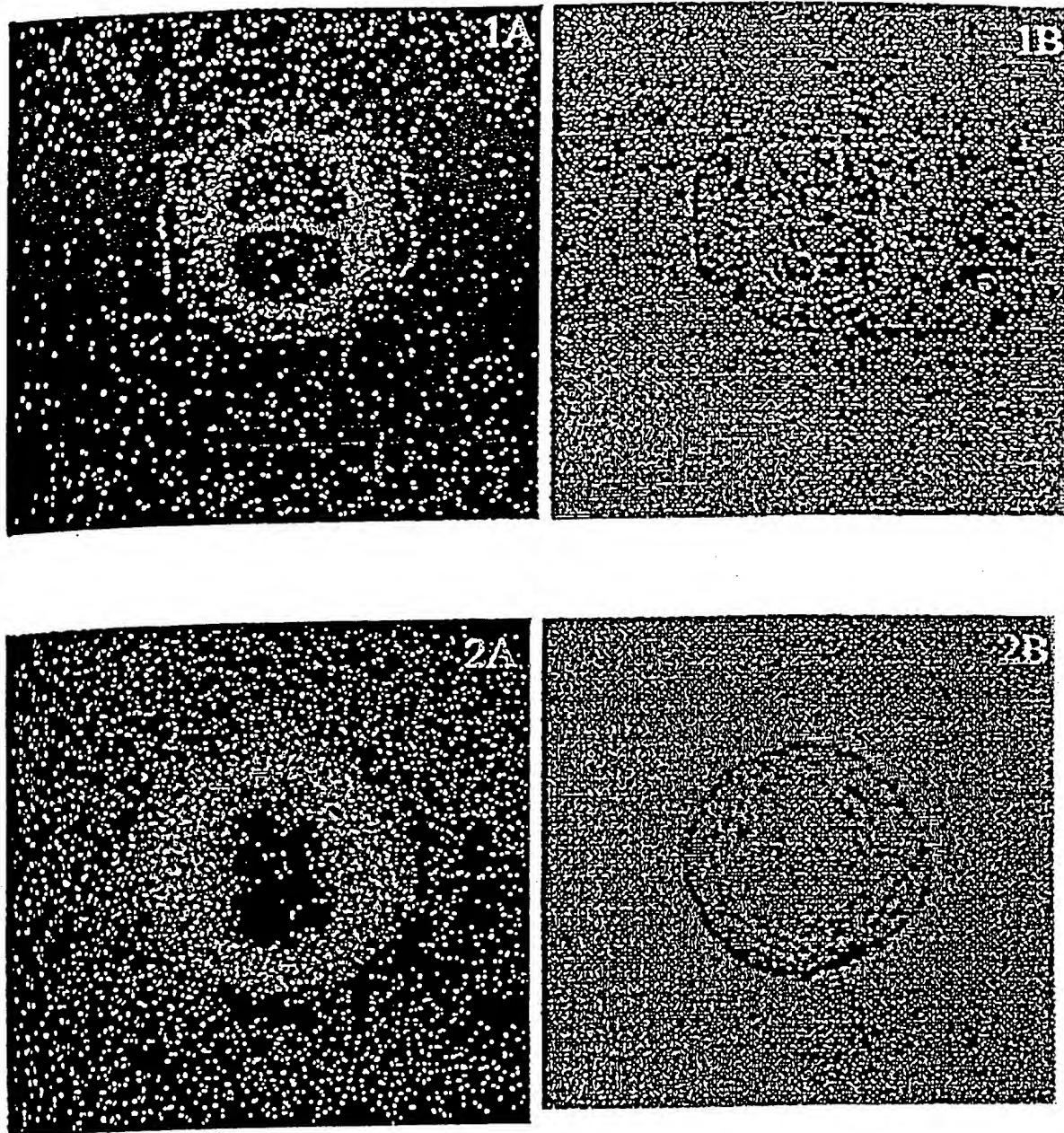


Fig. 3. Konfokale Fluoreszenz-(A) und Transmissionslicht-(B)-Mikroskopie-Bilder von Caco-2-Zellen, inkubiert mit DOX-WGA (1A) und Fluorescein-markiertem WGA (2A). Der Zelldurchmesser beträgt etwa 20µm.



3/5

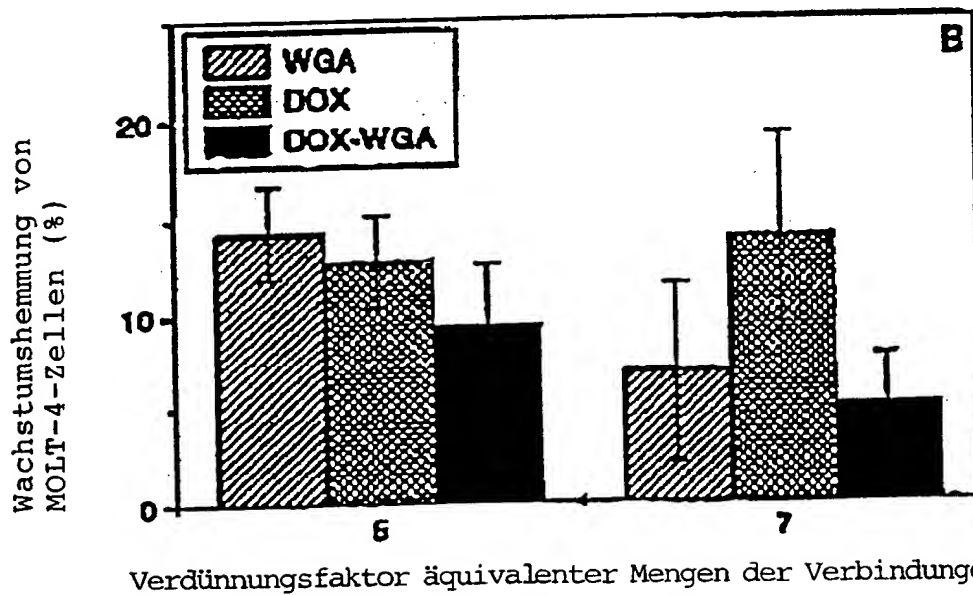
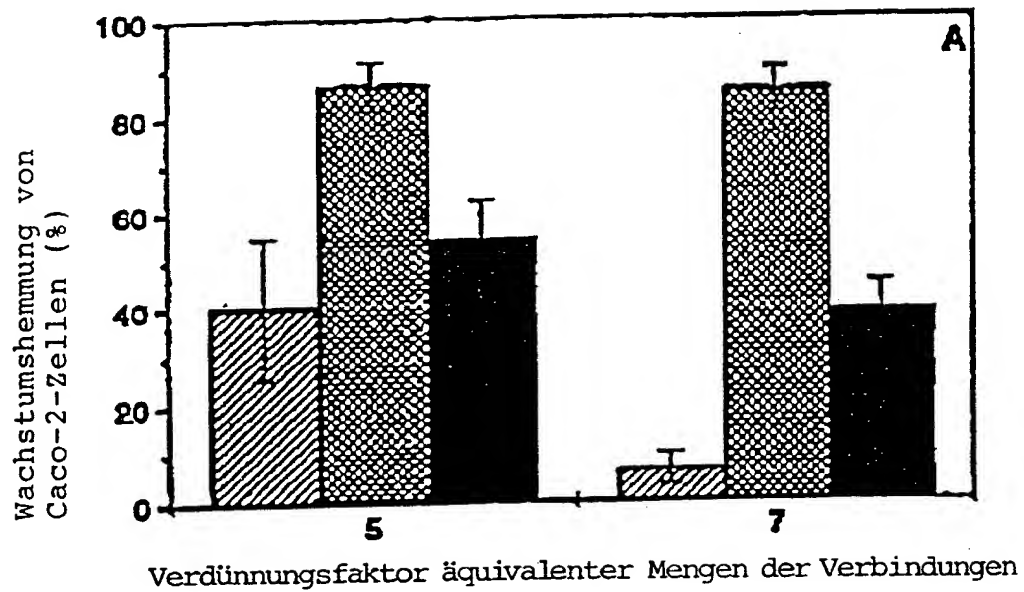


Fig. 5. Antiproliferative Wirkung von WGA, DOX-WGA und DOX bei äquivalenten Konzentrationen auf Caco-2- (A) und MOLT-4-Zellen (B), wie mittels XTT-Test festgestellt ( $n = 8$ , Mittelwert  $\pm$  S.A.)



4/5

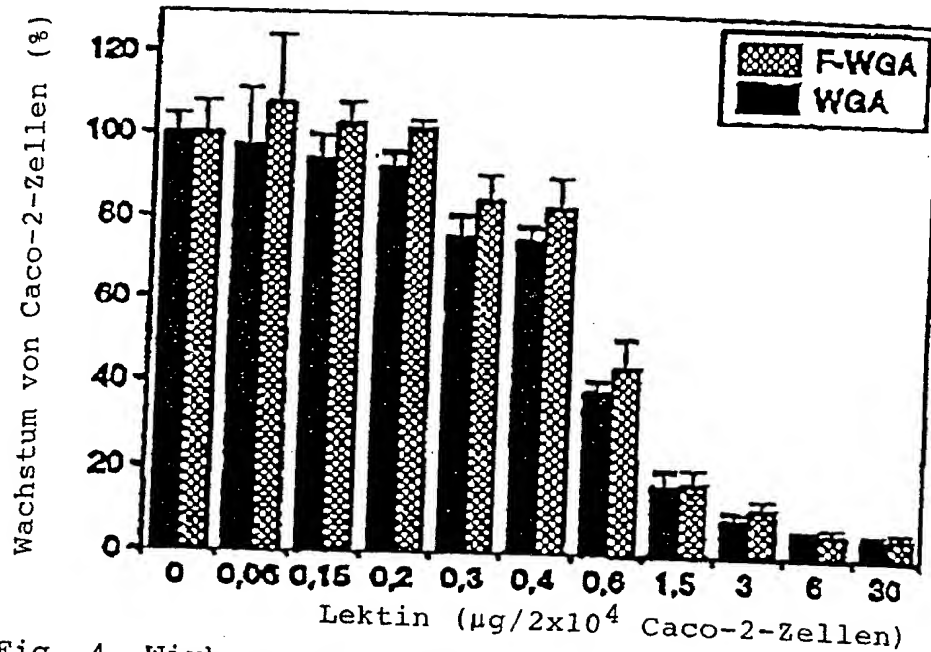


Fig. 4. Wirkung von F-WGA und WGA auf Caco-2-Zellwachstum, wie mittels XTT-Test festgestellt (n = 8, Mittelwert  $\pm$  S.A.)

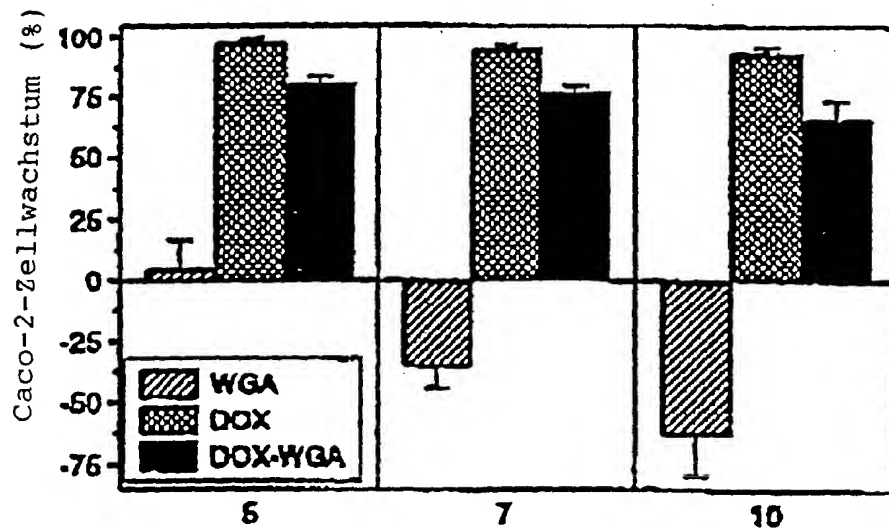


Fig. 6. Wirkung äquivalenter Mengen von WGA, DOX-WGA und DOX auf Caco-2-Zellwachstum, wie mittels BrdU-Test festgestellt (n = 8, Mittelwert  $\pm$  S.A.)





5/5

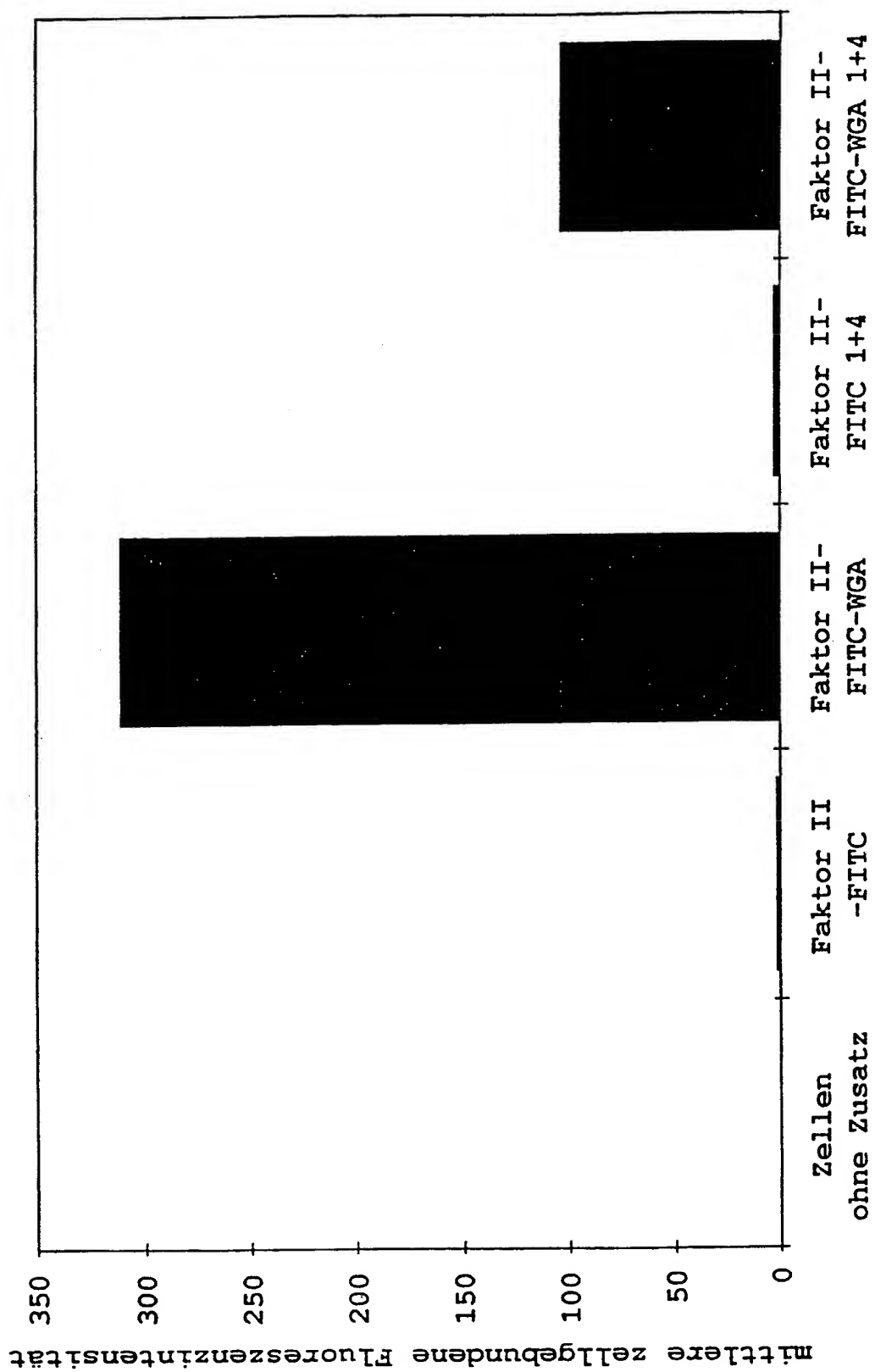


Fig. 7. Mittlere zellgebundene Fluoreszenzintensität von Caco-2 Zellen nach Inkubation mit Fluorescein-markiertem Prothrombin und F-Prothrombin-WGA-Konjugat



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 99/00150

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 578 706 A (GHETIE VICTOR F ET AL) 26 November 1996 (1996-11-26) claims 1-8 page 3, line 39 - line 40 ---	1-11
X	US 5 378 688 A (GLODE LEONARD M ET AL) 3 January 1995 (1995-01-03) claims 1,2 table IV ---	1-11
X	US 4 863 726 A (STEVENS PAUL ET AL) 5 September 1989 (1989-09-05) claim 9 --- -/--	1-11



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*8\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 October 1999

Date of mailing of the international search report

12. 11. 99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Uiber, P

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 99/00150

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>FREYSSINET JM ET AL: "Reversible inhibition of the in vitro coagulation of human plasma by lectins."  THROMB HAEMOST, OCT 29 1982, 48 (2)  P120-4, XP002119167  GERMANY, WEST  abstract  page 12, column 1, last paragraph -column 2, last paragraph  ---</p>	1-11
Y	<p>DATABASE WPI  Section Ch, Week 199233  Derwent Publications Ltd., London, GB;  Class B04, AN 1992-274007  XP002119168  &amp; JP 04 187644 A (NIPPON INST BIOLOGICAL SCIENCE), 6 July 1992 (1992-07-06)  abstract  ---</p>	1-11
P,Y	<p>WO 99 25383 A (HARRIS ROY ;CHURCH NICOLA JANE (GB); QUADRANT HEALTHCARE UK LIMITE)  27 May 1999 (1999-05-27)  claims 1-13  -----</p>	1-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/AT 99/00150

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 1-11  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐  
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I.2

Claims No.: 1-11

In view of the large number and the wording of patent claims, which make it difficult if not impossible to determine the scope of protection sought thereby, the present patent application does not meet the requirements of PCT Article 10 (compare also PCT Rule 6.1(a)) to the extent that no meaningful search can be carried out. (The subject matter of Claim 1 is not novel (PCT Article 33(2) since conjugates consisting of a lectin and an antibody (US5578706), GnRH (US5378688) or IL-2 (US4863726) are already known). For this reason, the search was directed towards those parts of the patent claims that appeared to be supported or disclosed as previously defined, namely those parts referring to the conjugate consisting of a lectin and a blood coagulation factor.

The applicant is reminded that patent claims or parts of patent claims relating to inventions for which no international search report has been established cannot normally be considered as subject matter of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). In its capacity as International Preliminary Examining Authority, the EPO as a rule does not carry out a preliminary examination for subject matters on which no search is available. This also applies in the case of changes made to the patent claims after the international search report (PCT Art. 19) has been received or in the case that the applicant files new patent claims during the process as defined by PCT Chapter II.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 99/00150

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5578706	A	26-11-1996	NONE		
US 5378688	A	03-01-1995	US	5631229 A	20-05-1997
			US	5492893 A	20-02-1996
			US	5488036 A	30-01-1996
			US	5786457 A	28-07-1998
			US	5707964 A	13-01-1998
			AU	5186090 A	26-09-1990
			NZ	232643 A	23-12-1992
			WO	9009799 A	07-09-1990
US 4863726	A	05-09-1989	US	4894227 A	16-01-1990
			AU	7636187 A	04-02-1988
			CA	1285875 A	09-07-1991
			EP	0256714 A	24-02-1988
JP 4187644	A	06-07-1992	NONE		
WO 9925383	A	27-05-1999	AU	1165899 A	07-06-1999





# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00150

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 A61K47/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 578 706 A (GHETIE VICTOR F ET AL) 26. November 1996 (1996-11-26) Ansprüche 1-8 Seite 3, Zeile 39 - Zeile 40 ---	1-11
X	US 5 378 688 A (GLODE LEONARD M ET AL) 3. Januar 1995 (1995-01-03) Ansprüche 1,2 Tabelle IV ---	1-11
X	US 4 863 726 A (STEVENS PAUL ET AL) 5. September 1989 (1989-09-05) Anspruch 9 --- -/--	1-11



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*8\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Oktober 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12. 11. 99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2260 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Uiber, P

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00150

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>FREYSSINET JM ET AL: "Reversible inhibition of the in vitro coagulation of human plasma by lectins."            THROMB HAEMOST, OCT 29 1982, 48 (2)            P120-4, XP002119167            GERMANY, WEST            Zusammenfassung            Seite 12, Spalte 1, letzter Absatz -Spalte 2, letzter Absatz            ----</p>	1-11
Y	<p>DATABASE WPI            Section Ch, Week 199233            Derwent Publications Ltd., London, GB;            Class B04, AN 1992-274007            XP002119168            &amp; JP 04 187644 A (NIPPON INST BIOLOGICAL SCIENCE), 6. Juli 1992 (1992-07-06)            Zusammenfassung            ----</p>	1-11
P,Y	<p>WO 99 25383 A (HARRIS ROY ;CHURCH NICOLA JANE (GB); QUADRANT HEALTHCARE UK LIMITE)            27. Mai 1999 (1999-05-27)            Ansprüche 1-13            -----</p>	1-11

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/AT 99/00150

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. 1-11  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1-11

Angesichts der großen Zahl wie auch des Wortlauts der geltenden Patentansprüche, welche es damit erschweren wenn nicht gar unmöglich machen, den durch sie erstrebten Schutzzumfang zu bestimmen, entspricht die vorliegende Patentanmeldung den Anforderungen des Artikels 6 PCT (vgl. auch Regel 6.1(a) PCT) in einem Maße nicht, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist. (Der Gegenstand des Anspruchs 1 ist nicht neu (Art. 33(2) PCT), weil Konjugate, bestehend aus einem Lektin und jeweils einem Antikörper (US5578706), GnRH (US5378688) oder IL-2 (US4863726) bereits bekannt sind) Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die auf Konjugate, bestehend aus einem Lektin und einem Blutgerinnungsfaktor

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 99/00150

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5578706	A	26-11-1996	KEINE		
US 5378688	A	03-01-1995	US	5631229 A	20-05-1997
			US	5492893 A	20-02-1996
			US	5488036 A	30-01-1996
			US	5786457 A	28-07-1998
			US	5707964 A	13-01-1998
			AU	5186090 A	26-09-1990
			NZ	232643 A	23-12-1992
			WO	9009799 A	07-09-1990
US 4863726	A	05-09-1989	US	4894227 A	16-01-1990
			AU	7636187 A	04-02-1988
			CA	1285875 A	09-07-1991
			EP	0256714 A	24-02-1988
JP 4187644	A	06-07-1992	KEINE		
WO 9925383	A	27-05-1999	AU	1165899 A	07-06-1999

1  
2  
3

24  
25  
26